

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA
E GENÉTICA**

Gabriela Fernanda Gonzaga Alanís

**RECONSTRUÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO EUROPEIA NA
POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA ATRAVÉS DO
MARCADOR M207 (rs2032658) DO CROMOSSOMO Y**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
cumprimento da disciplina TCC II
(BIO7016) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Andrea
Marrero

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alanís, Gabriela Fernanda Gonzaga

Reconstrução da contribuição Europeia na população de
Santa Catarina através do marcador M207 (rs2032658) do
cromossomo Y / Gabriela Fernanda Gonzaga Alanís ;
orientador, Andrea Rita Marrero - Florianópolis, SC, 2016.
83 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Antropologia Molecular. 3. Y
SNPs. 4. Ancestralidade Genética. I. Marrero, Andrea Rita.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

Gabriela Fernanda Gonzaga Alanís

**RECONSTRUÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO EUROPÉIA NA
POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA ATRAVÉS DO
MARCADOR M207 (RS2032658) DO CROMOSSOMO Y**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado para o cumprimento
da disciplina TCCII (BIO7016) e aprovado em sua forma final pela
Banca Examinadora

Florianópolis, 29 de novembro de 2016

Dr. ^a Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Andrea Rita Marrero, Orientadora
UFSC

Prof^a Dr^a Ilíada Rainha de Souza
UFSC

Prof^a Dr^a Sara Emelie Lofgren
UFSC

Prof^a Dr^a Yara Costa Netto Muniz
UFSC

Este trabalho é dedicado, assim como todas as minhas conquistas, aos meus amados pais, Raquel e Walter, meus maiores presentes da vida.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pelo dom da vida, pelas graças que ele me proporcionou e pelas oportunidades que, junto Dele, consegui criar. Agradeço por ter me dado saúde e forças para conseguir enfrentar e superar todos os desafios que me foram propostos. Agradeço também por ter nele um modelo a ser seguido, alguém que procuro me espelhar para me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, por me acolher, fazer eu me sentir parte deste local, por oferecer inúmeras oportunidades que eu pude aproveitar ao longo destes 6 anos, como o intercâmbio, que foi tão importante para minha vida pessoal e profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), órgãos financiadores que possibilitam a realização de nossos projetos de pesquisa.

Agradeço a Diretoria do curso de Ciências Biológicas, e também ao pessoal da secretaria, Aninha e Philipi, que sempre puderam atender meus pedidos, nos ajudaram com elementos da nossa formatura e mesmo quando eu queria inventar quebras de pré-requisito, eles me deram apoio necessário para conseguir com os professores responsáveis. Muito obrigada!

Aos homens participantes deste estudo que, além de contribuírem com a realização da pesquisa, tornaram-se o motivo pelo qual esse trabalho pode ser realizado com sucesso.

À banca avaliadora, Prof^ª Dr^a Andrea Marrero, Prof^ª Dr^a Ilíada Rainha de Souza, Prof^ª Dr^a Sara Emelie Lofgren, e Prof^ª Dr^a Yara Costa Netto Muniz.

Agradeço ao LAPOGE (Laboratório de Polimorfismos Genéticos) por ter me acolhido duas vezes em momentos diferentes da minha graduação, por ter oferecido oportunidades de aprendizado, pelo ambiente amigável e bem organizado.

Agradeço também os LAPOGEANOS maravilhosos que sempre levarei no meu coração, Prof.^a Ilíada, Prof.^a Andrea, Prof.^a Yara, Prof.^a

Sara, Emiliana, Kamila, Flávia, Pedro, Ewerton, Rafaela, Joane, Iara, Letícia, Mairiam, Sophia, Amanda (Mandu), Alice, Clisten, Mari, Emily, Manuela, Renan, Fernando. Em especial à Leili e a Mariana que super me ajudaram na realização das PCRs, eletroforese e auxílio na produção deste trabalho, tiveram paciência em me ensinar todos os procedimentos e como me organizar a realizá-los. Vocês foram demais, meu muito obrigada!

Quero agradecer em especial a Flávia que foi minha super parceira de TCC, como se a gente tivesse fazendo em dupla mesmo. Ela que me aguentou nas minhas TPMs, minhas zoeiras, ironias e no jeito esquecido que temos. Obrigada por me mostrar o que é organização, por me colocar na real, me acalmar e tentar viver a vida de boas! Gostei muito de estar contigo nessa jornada! Beijoss!

Agradeço minha maravilhosa orientadora, Andrea Rita Marrero, por ter me recebido de braços abertos no LAPOGE pela segunda vez, mesmo com todas as dificuldades, excesso de orientandos, mas sempre com um sorriso no rosto e aberta a ouvir e entender minhas angústias e dúvidas; por estar sempre disposta a nos ouvir, nos acalmar e resolver da melhor forma possível todos os obstáculos que tivemos ao longo dessa trajetória; que corrigiu e me propôs a reescrever este trabalho tantas vezes fosse necessário para que eu aprendesse como ele ficava melhor a cada vez e como me fazia feliz vê-lo cada dia mais perfeito (em minha opinião, pelo menos). Um mega beijo!!!

Agradeço muitíssimo também a Yara Costa Netto Muniz por estar sempre presente e disposta para nos ajudar na bancada e em todas as dúvidas que surgiram ao longo do TCC. Pelas dicas valiosíssimas de como fazer um gel de poliacrilamida perfeito e pelo seu otimismo contagiante dizendo que tudo daria certo, confiamos em vocês e realmente deu tudo certo!!! Muito obrigada por nos atender até nos finais de semana e altas horas da noite hahah. Um beijão!!!

Agradeço aos professores da UFSC, pelo carinho com que nos tratam, pela amizade conquistada, pela austeridade no comprimento das tarefas, estudos e principalmente por acreditarem que somos capazes. Vocês todos me ajudaram e foram muito importantes na minha vida acadêmica, pessoal e no desenvolvimento deste trabalho. Principalmente nesta reta final da graduação, aos professores Edmundo C. Grisard, Patrícia H. Stoco, Glauber Wagner e Carlos C. Pinto que me ajudaram muito no direcionamento da minha carreira, foram pacientes em esclarecer minhas angústias e dúvidas, meu muitíssimo obrigada!

Agradeço em especial meus maravilhosos pais, Raquel e Walter, por estarem sempre perto de mim quando precisei, por serem meu eterno porto seguro, por chamarem minha atenção às coisas realmente

importantes para vida e pelas inúmeras vezes, quando a situação estava ruim, não fraquejaram para que a família continuasse em pé. A eles além do agradecimento desta conquista dedico a minha vida.

A minha querida mãe, Raquel, por ser a mulher mais guerreira e forte que eu conheço, por sempre estar disposta a fazer tudo por nós e a buscar as melhores soluções para qualquer problema que possamos ter. Por ter nela um exemplo de coragem, compaixão e amor incondicional. Ao meu fofo pai, Walter, por ser um exemplo de superação e de alguém que sempre me lembra de que o mundo é cor-de-rosa, e ele já viu o mundo assim, tenho que acreditar. Por sempre conversar comigo nos momentos que eu mais precisei, buscando objetivar meus sentimentos e lembrar que “*todo pasa*”, e passa mesmo.

Agradeço minha irmã, Andrea, que sempre está por perto de mim, mesmo quando estamos na TPM e nosso santo se estranha um pouco, mas sinto que nos amamos acima de tudo e que sempre vou poder contar com ela, e ela comigo.

Agradeço imensamente ao meu namorado Felipe, por estar sempre do meu lado, tentando me acalmar, dizendo que tudo ia ficar bem. Por todo o companheirismo e compreensão. Obrigada por fazer parte da minha vida, lindo! <3 Te amo!

Agradeço aos meus amigos do grupo “BioBonitos”, Fernanda Lamin Henrique (Felhuxca), Carolina Mallmann Erbes (Carols), Luís Eduardo Abatti (Lu/Dudi), Douglas Diniz (Doug) e Natália Caron (Nati) que sempre estiveram por perto, não importando a ocasião, me dando dicas, puxando minha orelha, rindo comigo e me ensinando o que é uma amizade verdadeira. Amo vocês, meus goxtosex!

Agradeço meus amigos da vida que sempre estiveram por perto quando eu precisei, me fizeram rir e sempre me deram incentivo quando eu estava desanimada, Daniel Maioral (tubalhão) e Fred (ermão), vocês moram aqui ó <3.

Agradeço meus amigos que fiz durante o intercâmbio, Camila Dias Marques dos Santos (Camis, Camile), Lilian da Silva Vaz (Li, Liliane, A outra, Mulher), Washington Roberto da Silva Neto (Washin), (João) Marcos Vasconcelos (Queri), Rafael Lemes (Rafa) e Júlio Mariano (Ju). Sem vocês eu não teria aguentado esse tempo todo longe da minha família e amigos, obrigada por serem minha família lá e aqui. Vou levar vocês sempre no meu coração e nas minhas memórias. Estou louca para chegar março quando vocês vão vir aqui me visitar. S2 Mil beijos e carinhos!!!

Agradeço minha mana de coração Thaís de Souza Piazza por ser minha inspiração de mulher determinada que busca tudo o que quer e

bem-sucedida. Obrigada por ser minha irmã desde os tempos do ensino fundamental, você será para sempre minha irmã que eu amo demais!

A todos os meus colegas do curso de Ciências Biológicas (diurno e noturno), que de alguma maneira tornam minha vida acadêmica cada dia mais desafiante, que de tanto me perguntarem me fizeram pensar e, pensando, aprendi cada vez mais a buscar as respostas para satisfazer-lhes o interesse e me aperfeiçoar na matéria, com a humildade dos que aspiram à sabedoria repetindo a frase filosófica ‘Só sei que nada sei’. Peço a Deus que os abençoe grandemente, preenchendo seus caminhos com muita paz, amor, saúde e prosperidade. ♥

“A única forma de chegar ao impossível, é
acreditar que é possível. ”
(Lewis Carroll, Alice no País das Maravilhas,
1865)

RESUMO

Sempre houve grande interesse pela história de surgimento da humanidade e de como sua distribuição geográfica influenciou nos hábitos atuais. A partir do momento em que as técnicas moleculares foram se aprimorando, novas informações foram adicionadas a essas questões. É de conhecimento geral que os europeus fizeram parte da colonização e povoamento de Santa Catarina. Este trabalho visa analisar e discutir como essa contribuição europeia está presente no perfil genético dos catarinenses atuais. Para tal, foi usado um marcador genético SNP do cromossomo Y denominado M207 (rs2032658). Os marcadores genéticos são segmentos de DNA cuja sequência e posição no genoma são notavelmente conhecidas. Como praticamente não há recombinação no cromossomo Y, a mutação é a única fonte de variabilidade genética ao longo das gerações entre indivíduos masculinos, sendo transmitida de pai para filho, tornando este tipo de marcador ideal para os objetivos do presente estudo. Os participantes foram 152 indivíduos não aparentados que assinaram o TCLE e doaram voluntariamente amostra biológica para o estudo que tem aprovação no CEP SH UFSC. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita por PCR e visualizada em gel de poliacrilamida 10%. Foram realizados cálculos das frequências alélicas e análises da ascendência informada pelo indivíduo. Verificou-se que a estrutura populacional tem predominância de ascendência europeia, corroborando dados históricos e registros antropológicos para o Estado. De forma geral, observou-se um elevado número de indivíduos de autodenominação europeia, que de fato se confirmou pelo marcador M207. Foi observado também uma frequência muito baixa de indivíduos auto classificados como africanos e ameríndios. A presença destes componentes pode ser explicada pelo fato da população brasileira ser uma das mais heterogêneas do mundo. Conclui-se que este polimorfismo precisa ser mais amplamente estudado quanto à sua relação com a ascendência europeia no Estado e também é interessante que se faça uma associação com outros marcadores genéticos do cromossomo Y para melhor compreensão da atual formação da população de Santa Catarina.

Palavras-chave: Antropologia Molecular; Y-SNPs; Ancestralidade Genética

ABSTRACT

There has always been great interest in the history of the emergence of humanity and how its geographic distribution influenced current habits. As molecular techniques improved, new information was added to these questions. It is common knowledge that Europeans were part of the colonization and settlement of Santa Catarina. This study aims to analyse and discuss how this European contribution is present in the genetic profile of the current residents of Santa Catarina. For this, a SNP genetic marker of the Y chromosome named M207 (rs2032658) was used. Genetic markers are segments of DNA whose sequence and position in the genome are notably known. As there is virtually no recombination on the Y chromosome, mutation is the only source of genetic variability across generations between male individuals, being transmitted from father to son, making this type of marker ideal for the purposes of the present study. Participants were 152 unrelated individuals and voluntarily donated a biological sample to the study that is approved at CEPESH-UFSC. DNA was extracted from whole blood and genotyping done by PCR and visualized on 10% polyacrylamide gel. Calculations of the allele frequencies and analysis of the ancestry informed by the individual were performed. It was verified that the population structure has predominance of European ancestry, corroborating historical data and anthropological records for the State. In general, a large number of individuals with European self-denomination were observed, which was in fact confirmed by the marker M207. We also observed a very low frequency of individuals classified as African and Amerindian. The presence of these components can be explained by the fact that the Brazilian population is one of the most heterogeneous in the world. It is concluded that this polymorphism needs to be more extensively studied regarding its relation with European ancestry in the State and it is also interesting that an association with other genetic markers of the Y chromosome is made to better understand the present formation of the population of Santa Catarina.

Keywords: Molecular Anthropology; Y-SNPs; Genetic Ancestry

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Posição geográfica do Arquipélago dos Açores. Açores fica a aproximadamente 1.600 km do Continente Europeu, a 1.450 km da África, a 3.900 km da América do Norte e a 6.400 km do Norte do Brasil.....	31
Figura 2: Representação do cromossomo Y humano.	37
Figura 3: Árvore filogenética do cromossomo. Aumento da árvore filogenética evidenciando o marcador estudado. Mapa genético global dos principais eventos mutacionais conhecidos.....	39-40
Figura 4: Cromossomo Y, em destaque a região com o polimorfismo de um único nucleotídeo.	47
Figura 5: Imagem de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por transiluminador UV. Fragmentos de DNA de diferentes tamanhos podem ser visualizados: 124 pb e 118 pb.	50
Figura 6: Mapa mostrando a proporção dos alelos do DNAY em cada cidade, bem como sua localização. Figura feita a partir de dados da Tabela 1. Mapa de Santa Catarina	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.: Quantidade de alelos ancestrais e derivados de acordo com as diferentes cidades51

Tabela 2: Frequência total de voluntários para cada alelo do marcador M207.....55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequência dos primers utilizados para a identificação do polimorfismo de um único nucleotídeo M207 (rs2032658), segundo Medina *et al.*, 2014. Os nucleotídeos não complementares estão apresentados em letras minúsculas. A variação nucleotídica (A/G) define o estado alélico ancestral/ derivado, respectivamente44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Classificação e distribuição percentual de frequência de homens por ancestralidade informada. (Número de Indivíduos (Porcentagem)). NI = Não Informado52

Gráfico 2: Classificação e distribuição numérica e percentual da frequência de homens caracterizados pelo alelo A ancestral de acordo com a ancestralidade informada. (Número de Indivíduos (Porcentagem))53

Gráfico 3: Classificação e distribuição numérica e percentual da frequência de homens caracterizados pelo alelo G derivado de acordo com a ancestralidade informada. (Número de Indivíduos (Porcentagem))54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
A	Adenina
C	Citosina
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTG	Centro de Tradições Gaúchas
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<i>et al.</i>	“e outros”, do latim <i>et alii</i>
G	Guanina
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
HU-UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
M	Molar
mA	Miliampère
Mb	Mega pares de bases = 1.000.000 pb
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
miRNAs	micro RNAs
mL	mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MSY	do inglês: Male Specific Y/ Y específico masculino
mtDNA	DNA mitocondrial
N	Número amostral
ng	Nanogramas
NRV	Região não recombinante do Y, do inglês <i>non recombinant region of Y chromosome</i>
°C	Grau Celsius
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAR	Região pseudoautossômica

pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol
RCF	Força Centrífuga Relativa, do inglês <i>Relative Centrifugal Force</i>
rpm	Rotações por minuto
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Timina
TA	Temperatura Ambiente
TBE	Tris/Borato/EDTA, solução tampão contendo uma mistura de base T (Tris), ácido Bórico e EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
V	Volts
W	Unidade de potência (<i>Watt</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. FORMAÇÃO DA POPULAÇÃO CATARINENSE	28
1.2. COLONIZAÇÕES VIZINHAS	33
1.3. MARCADORES GENÉTICOS E ESTUDOS DE ANCESTRALIDADE	35
2. OBJETIVOS	41
2.1. OBJETIVO GERAL	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	43
3.2. CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS	43
3.3. MARCADORES DO CROMOSSOMO Y	43
3.4. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DA AMOSTRA	44
3.5. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	45
3.6. REAGENTES E SOLUÇÕES	45
3.7. PROCEDIMENTO	45
3.7. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	46
3.8. ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO	48
3.9. ANÁLISES DOS DADOS	50
4. RESULTADOS	51
5. DISCUSSÃO	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos controles.	71
ANEXO B - Questionário para indivíduos controles.	73

1. INTRODUÇÃO

A história de como a humanidade surgiu e de como sua distribuição geográfica tem influência nos hábitos culturais, sempre foi de grande interesse para diversos cientistas tais como geneticistas e antropólogos (SALZANO; HUTZ, 2005). Assim como outras espécies de seres vivos sofreram mudanças ao longo de suas gerações, a humanidade também sofreu modificações ao longo dos anos no que diz respeito a cultura, sociedade, distribuição geográfica e interesses econômicos. A partir do momento em que as técnicas moleculares foram se aprimorando, onde se conseguiu obter mais dados genéticos, as perguntas científicas passaram de puramente taxonômicas para o processo de população, fluxo alélico e deriva genética. Por que as mais antigas civilizações começaram em determinadas regiões? De onde vieram nossos ancestrais?

Visando responder estas e outras perguntas, a Antropologia Molecular (ou Antropologia Biológica) surgiu como ciência que busca reconstituir as origens da humanidade, usando um enfoque comparativo com os temas anteriormente citados e relacionados à teoria da evolução, à reconstrução da diáspora humana, à Epidemiologia Genética e às Ciências Forenses (CRAWFORD, 2000). Ao longo das últimas décadas, os geneticistas tem focado seus estudos sobre o DNA mitocondrial (mtDNA) e do cromossomo Y a fim de responder algumas questões sobre como foi o povoamento original das Américas (LONG; BORTOLINI, 2011).

Para realizar esses estudos de origem e heterogeneidade biológica, associam-se registros históricos com marcadores moleculares (TORRES, 2014), podendo dessa forma construir uma história sobre as populações sabidamente miscigenadas, como é o caso da população brasileira, inclusive a do Estado de Santa Catarina (MOSIMANN, 2010).

As terras sul-americanas eram ocupadas por índios ou desertores de muito antes do seu registrado descobrimento. Estimativas mostram que a população indígena era de 5 milhões no território brasileiro, e hoje habitam pouco mais de 700.000 (LUCIANO, 2006). Desde que o Brasil foi oficialmente descoberto em 1.500 (MOSIMANN, 2010), o território passou a se formar politicamente durante cinco longos séculos de conquista, dominação e ocupação (FLORES, 2000), tanto pelo rei de Portugal e Espanha (Tratado de Tordesilhas).

A coroa portuguesa incentivava políticas de expansão dadas razões políticas, econômicas, sociais e porventura técnicas (FARIAS, 2000) e então a povoação do território brasileiro se deu primeiramente em áreas litorâneas próximas ao oceano Atlântico. Os imigrantes

portugueses, em sua grande parte, dedicavam-se a plantação de cana-de-açúcar.

Mais tarde, durante os séculos XVII e XVIII, a exploração de gado na região sul e a descoberta de ouro na região sudeste do território brasileiro levaram a povoação de terras além do litoral, através de expedições denominadas bandeiradas. A completa povoação da região sul ocorreu no século XIX guiada pela implantação e exploração de grandes lavouras de café, o que incentivou o trabalho assalariado e o acúmulo de capital, contribuindo para o surgimento de diversas cidades (DANTAS, 2007).

Historiadores relatam que a Ilha de Santa Catarina só começou a receber povoamento efetivo português no século XVII, quando o bandeirante paulista Francisco Dias Velho se instalou nessas terras. (MOSIMANN, 2010) Dias Velho se tornou então o fundador do povoado de Nossa Senhora do Desterro, atual Florianópolis, e contava com a mistura de portugueses, africanos e índios, somando aproximadamente 400 habitantes (FLORES, 2000).

1.1. FORMAÇÃO DA POPULAÇÃO CATARINENSE

A diversidade étnica do Brasil e, especificamente, de Santa Catarina inclui o indígena, ameríndio que habitava as terras desde a chegada do *Homo sapiens* no extremo austral da América do Sul (por volta de 30.000 anos de acordo com Saint Pierre, De *et al.*, 2012, o africano, trazido como escravo contra sua vontade, para prestar serviços pesados em troca de suas próprias vidas e os europeus tais como os portugueses, açorianos, alemães, italianos, ucranianos, poloneses, austríacos, e também os árabes e orientais vindos de diversas ondas migratórias. Os europeus se diferenciaram por trazer conhecimento sobre empreendedorismo, a iniciativa de mudar de vida e a capacidade de unir forças para se adaptar a um novo espaço, unindo sua bagagem cultural e incorporando a nova (NICOCELI, 2014).

Ameríndios

Segundo Kaká Werá Jecupé em seu livro “A Terra dos Mil Povos: Historia Indígena do Brasil Contada por um Índio”:

“...o índio não chamava nem chama a si de índio. O nome “índio” veio trazido pelos ventos dos mares do século XVI, mas o espírito “índio” habitava o Brasil antes mesmo de o tempo existir e se estendeu pelas Américas para, mais tarde, exprimir muitos nomes, difusores da tradição do sol, da lua e do sonho. [...] Para o índio, toda a palavra possui espírito. Um

nome é uma alma provida de um assento, disse na língua *ayvu*. É uma vida entonada em uma forma. Vida é o espírito em movimento. Espírito, para o índio, é silêncio e som. O silêncio-som possui um ritmo, um tom, cujo corpo é cor. Quando o espírito é entonado, torna-se, passa a ser, ou seja, possui um tom. Antes de existir a palavra “índio” para designar todos os povos indígenas, já havia o espírito índio espalhada em centenas de tons. Os tons se dividem por afinidade, formando clãs, que formam tribos, que habitam aldeias, constituindo nações. Os mais antigos vão parindo os mais novos. O índio mais antigo dessa terra hoje chamada Brasil se auto denomina *Tupy*, que na língua sagrada, o abanhaenga, significa: *tu* = som, barulho; *py* = pé, assento; ou seja, o som-de-pé, o som-assentado, o entonado. De modo que índio é uma qualidade de espírito posta em uma harmonia de forma’ (JECUPÉ, 1998).”

Muito se fala sobre a história dos ameríndios em Santa Catarina, mas pouco se sabe sobre suas crenças, ritos, estrutura social, uma vez que são poucos os registros toponímicos ou vocabular (AVILA, 2010). É frequente associar o ancestral ao Homem do Sambaqui, porém sua participação na história catarinense não pôde ser muito bem estudada visto que não tiveram contato algum com os europeus e a única herança que deixaram foram os registros arqueológicos na estrutura calcária do Sambaqui (MOSIMANN, 2010).

O grupo com maior representatividade e mais próximo cronologicamente da época do “descobrimento” do Brasil é o Tupi-Guarani (PIAZZA; HÜBENER, 1997), conhecido na época como Carijó ou Cario. Esse grupo localizava-se da região do Chaco até o Atlântico, incluindo partes dos países vizinhos (MONTEIRO, 1998). Dentro do Brasil, os Guarani se instalaram em área hoje conhecidas pelos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul.

William Denevan projetou a existência de quase 5.000.000 de ameríndios no atual território brasileiro no ano 1500 por ocasião da chegada de Pedro Álvares Cabral (BETHELL, 1998). De acordo com o Censo Demográfico de 2010, esse contingente populacional está reduzido a aproximadamente 900 mil pessoas que se declaram ou se consideram indígenas. A grande redução da população Guarani ocorreu devido a novas doenças de origem principalmente europeia ou africana, associadas à ação dos bandeirantes, e a escravização imposta pelo governo espanhol e português (DERENGOSKI, 2002).

Africanos

A introdução dos africanos no Brasil com o propósito de torná-los escravizados pode ser medida e datada, em sua grande maioria. Mais de quatro milhões de africanos foram introduzidos desde a chegada do primeiro navio com a expedição de Martim Afonso de Souza, em 1531, até a chegada do último em 1856, no porto do Rio de Janeiro (PEDRO *et al.*, 1988). A escravidão no Brasil durou mais de trezentos anos e deixou marcas indeléveis na história, principalmente no aspecto da formação da sociedade e suas relações.

Os indivíduos escravizados vinham de vários locais da África, como Congo, Moçambique, Cabinda, Angola, Costa da Guiné, Rebola, Mina, Benguela e Monjolo (TORRES, 2014). Primeiramente, eram alojados nas principais metrópoles brasileiras, como Rio de Janeiro, Salvador e Recife, com a finalidade de serem redistribuídos para todo o país (PIAZZA; HÜBENER, 1997). Para os portugueses, Santa Catarina não era muito importante em termos econômicos (PEDRO *et al.*, 1988), já que a atividade agrícola extensiva e a monocultura não eram muito fortes; pessoas escravizados então, acabavam indo para São Paulo e também para o Rio da Prata, onde podiam ser mais valiosos (PIAZZA; HÜBENER, 1997). A economia de Santa Catarina era basicamente de subsistência, não sobrando muito para mandar seus excedentes para outras partes da Colônia, então de fato, estes indivíduos escravizados não tinham presença muito forte no território catarinense (PEDRO *et al.*, 1988).

Europeus

O arquipélago açoriano foi descoberto pelos portugueses no século XV (FLORES, 2000), é composto por 9 ilhas e localiza-se a norte do Oceano Atlântico (Figura 1). A princípio, as terras eram desabitadas à data de sua descoberta (LIMA, 2008). Com o passar dos anos, sua ocupação passou a ser intensificada e a migração para as ilhas um fato consumado.

Figura 1: Posição geográfica do Arquipélago dos Açores. Açores fica a aproximadamente 1.600 km do Continente Europeu, a 1.450 km da África, a 3.900 km da América do Norte e a 6.400 km do Norte do Brasil.



Fonte: <http://thoth3126.com.br/terremoto-de-59o-no-arquipelago-dos-acoers/> (2016).

A população açoriana é muito semelhante à população de Portugal continental. Os pontos de maior destaque referentes às origens da população fundadora dos Açores podem ser sintetizados em alguns pontos principais segundo esclareceu Matos, Matos, Mendonça (1989a, 1989b, 1996 *apud* LIMA, 2008): a) A maioria dos povoadores seria proveniente de Portugal continental b) Indivíduos provenientes do arquipélago da Madeira também estão representados como povoadores iniciais; c) Indivíduos de origem judaica, também estão relacionados com o povoamento; d) A presença de escravizados (negros e espanhóis muçulmanos «mouriscos») é, também, frequentemente, referida; e) Indivíduos provenientes de países da Europa, tais como Itália, França, Alemanha e Inglaterra também terão feito parte do conjunto de povoadores iniciais e f) Os flamengos (grupo étnico germânico) contribuíram, sobretudo, no que se refere às ilhas do grupo central (ilhas Terceira, Graciosa, São Jorge, Pico e Faial).

Pelo fato de as ilhas açorianas serem isoladas, a comunicação entre elas era muito difícil, dependendo de grandes embarcações e dos capitães donatários que comandavam cada pedaço de terra (FLORES, 2000). Como consequência dos mandos e desmandos dos capitães, muitas famílias viviam com recursos escassos e pouca terra, enquanto outras se tornavam os grandes proprietários das terras (FLORES, 2000). Tendo

conhecimento de que a situação dos açores não era favorável para muitas famílias, o rei de Portugal decidiu tomar algumas medidas que favoreciam seu reino, em primeira instância, e de quebra poderia melhorar a qualidade de vida açoriana.

Durante meados do século XVI e XVII, para garantir o seu império, o então rei de Portugal estimulou que alguns açorianos deixassem suas terras e fossem povoar as colônias portuguesas da América (FLORES, 2000). Massas anônimas de homens e mulheres migravam para as terras coloniais com a promessa de uma vida melhor, gados, terras, ferramentas e esperança de que estariam seguros no novo mundo. Embora muitas das promessas não tivessem sido cumpridas, isso não impediu que as migrações acontecessem.

A partir da década de 1850 a colonização no Brasil passou a ser mais estruturada e sem tantos imprevistos, resultando assim em grandes transformações no Brasil Imperial (PIAZZA; HÜBENER, 1997). Na Europa, os países de língua **alemã**, principalmente, sofreram muito com o crescimento populacional durante a primeira metade do século XIX, onde a concentração das terras agrárias ficavam nas mãos da alta aristocracia, dificultando a vida camponesa (PIAZZA; HÜBENER, 1997). Os alemães e os italianos vieram para Santa Catarina no decorrer do século XIX. Paralelamente à crise alimentar na Europa, estava também o interesse da América em recrutar as classes menos favorecidas da Europa com a campanha de que na América havia mais riquezas a serem descobertas e melhoria nas condições socioeconômicas e políticas (PIAZZA; HÜBENER, 1997). A preferência dos alemães quanto a localização no Estado de Santa Catarina foi o Norte. Os primeiros a desembarcar aqui, em 1828, fundaram São Pedro de Alcântara; um segundo grupo chegou em 1850 e instalou-se na região do Vale do Itajaí, fundando Blumenau e outros povoados, entre eles a Colônia Militar de Santa Tereza, Colônia Teresópolis, Colônia Itajaí-Brusque e outras (PIAZZA; HÜBENER, 1997). A contribuição alemã foi extremamente marcante através da introdução de seus hábitos e costumes, com trabalho e determinação, constituíram pequenas propriedades, iniciaram negócios e prosperaram. Conforme recebiam suas terras, os empreendedores plantavam os alimentos típicos e tradicionalmente cultivados na região, mas também introduziam novos alimentos dos quais já estavam acostumados na sua terra natal, como é o caso da carne defumada, linguiça e queijos dos mais diferenciados sabores (PIAZZA; HÜBENER, 1997).

Muitos fatores levaram os **italianos** a emigrarem de seu país e ir em busca de novas oportunidades. Porém, não apenas a população da Itália, mas de toda a Europa estava afundada na miséria no século XIX.

“...devido aos problemas políticos a pressão econômica e social, a carestia, etc. apareceram no cenário mundial correntes emigratórias que da Europa se dirigiam para as novas áreas, tais como Estados Unidos, a Austrália, e a América com Sul, que necessitavam de mão-de-obra e que ofereciam esperanças de uma vida mais fácil e melhor aos imigrantes.” (PETRONE, 1976)

Os primeiros imigrantes italianos de que se tem registro, vieram para o Brasil em 1836, porém a partir da década de 1860 houve uma imigração significativa com aproximadamente 5.000 italianos (PIAZZA, 1976).

A Unificação Italiana foi um marco para a emigração dos italianos (SANTOS, 1972). A transição entre um modelo de produção feudal para um sistema capitalista afetou diretamente as condições sociais no continente europeu favorecendo a migração para o Brasil (NOVAIS; SEVCENKO, 1998). Segundo atesta a estatística apresentada por Piazza (1976, *apud* NASH 1939) no período de 1881/90 o número de italianos supera o de portugueses e alemães imigrados para o Brasil, ou seja, os italianos se tornaram detentores da primazia imigratória. A maioria dos italianos que migrou para o Brasil era de origem humilde, principalmente das regiões rurais da Itália e se concentraram na região Sul do Brasil (PIAZZA, 1976).

1.2 COLONIZAÇÕES VIZINHAS

O processo de colonização da América do Sul não foi um processo homogêneo (BUENO; DIAS, 2015), porém envolveu as mesmas três populações principais: nativos americanos, europeus e africanos ocidentais. Em todas as Américas, as diferenças históricas no padrão de colonização e migração resultaram em uma ampla gama de contribuições genéticas parentais para representar as populações rurais e urbanas (SANS, 2000).

Argentina

A colonização espanhola se deu ao longo dos séculos XVI e XVII. O nome Argentina vem de *argentum*, prata em latim, metal precioso encontrado pelos espanhóis e enviado para o rei da Espanha em pequenas quantidade (LEVENE, 1950).

No século XV quando Portugal e Espanha começaram a buscar estratégias expansionistas, os interesses das duas coroas entraram em conflito (FROTA, 1991). Logo depois da coroa portuguesa chegar ao Brasil e determinar o Tratado de Tordesilhas, a coroa espanhola não tardou em enviar navios para a ocupação do seu espaço territorial (FROTA, 1991). Antes da chegada dos espanhóis à América, no começo do século XVI, o norte da Argentina fazia parte do Império Inca e a região dos Pampas era habitada por nações autóctones (FROTA, 1991).

Os primeiros espanhóis que chegaram à região, foram com a expedição de Américo Vespúcio, que contornou a entrada do Rio da Prata em 1502 (LEVENE, 1950). Posteriormente, o navegador espanhol Juan Díaz de Solís, em busca de chegar à Ásia pelo ocidente, ou seja, encontrar a rota marítima que se comunicasse com a Ásia ocidental, descobriu o Rio da Prata (LEVENE, 1950). O ano exato do descobrimento do Rio do Prata é ainda controverso, porém alguns historiadores acreditam que foi em 1513 (LEVENE, 1950). Ao chegar nas terras instruídas pelo rei, Solís e mais oito companheiros desembarcaram e encontraram alguns indígenas que prepararam uma emboscada para eles e mataram alguns deles (LEVENE, 1950). Os sobreviventes embarcaram novamente até a Espanha, mas relatos contam que muitos destes naufragaram ou se refugiaram na Ilha de Santa Catarina. (LEVENE, 1950). Após esse incidente, começa de fato a colonização espanhola na América. Numa tentativa de impedir a fixação dos portugueses no território do Prata, em 1536 é fundada a atual capital da Argentina, Buenos Aires, por D. Pedro de Mendoza (FROTA, 1991).

Uruguai

Localizado no sul da América do Sul o Uruguai faz fronteira com o Rio Grande do Sul. A população uruguaia foi caracterizada como sendo de ascendência europeia, com uma pequena contribuição de afrodescendentes (RIBEIRO, 2007). Historicamente, a identidade uruguaia foi marcada pelo genocídio das populações nativas ameríndias encontradas no território no momento da conquista europeia e até o século 19 (SANS *et al.*, 2012).

Entretanto, estudos passados mostram que houve a contribuição genética de outros grupos étnicos na constituição do povo uruguaio. Um grupo de pesquisadores examinou duas regiões do Uruguai para confirmar suas ideias: Montevideo (e a área ao redor, situado no Sul do país) e Tacuarembó (no Nordeste). As contribuições étnicas foram diferentes para os dois lugares. Em Montevideo as proporções obtidas foram de 86% Europeu, 6% Africano, e 8% Ameríndio, enquanto para

Tacuarembó foram 54% Europeu, 15% Africano e 31% Ameríndio (SANS *et al.*, 1997). Isso ilustra a dificuldade de encontrar um padrão único de colonização, e que mesmo em um mesmo país, a composição étnica pode variar bastante pois possuem histórias e fatos históricos diferentes.

1.3 MARCADORES GENÉTICOS E ESTUDOS DE ANCESTRALIDADE

Os marcadores genéticos são segmentos de DNA cuja sequência e posição no genoma são notavelmente conhecidas (COSTA, 2011). O DNA-Y tem a vantagem de ser transmitido somente através da linhagem patrilinear, permitindo, desse modo, traçar linhagens filogenéticas paternas. Os marcadores genéticos do cromossomo Y, assim como os do DNA mitocondrial, chamado também de “marcadores de linhagem”, são diferentes dos marcadores autossômicos pois não sofrem tantas modificações de geração em geração (CARVALHO, 2007), tendo sua taxa de mutação praticamente nula.

O estudo de polimorfismos dos SNPs restringido à regiões específicas do cromossomo Y pode ser útil tanto para medicina forense como para testes de paternidade, por exemplo, uma vez que haplogrupos de Y mostram especificidade regional, viabilizando informações úteis sobre a origem geográfica de um indivíduo ou de provas sob investigação criminal (CARVALHO *et al.*, 2008), e no caso do filho ser do sexo masculino, pode-se excluir facilmente aquele a quem é conferida a paternidade, no caso de se tratar de uma exclusão de paternidade (CARVALHO, 2007), respectivamente.

Como praticamente não há recombinação no cromossomo Y, a mutação é a única fonte de variabilidade genética ao longo das gerações entre indivíduos masculinos, sendo transmitida de pai para filho (CARVALHO, 2007) e essa é a grande vantagem de se utilizar marcadores do cromossomo Y: os haplótipos, que são as combinações alélicas ao longo do cromossomo, geralmente ficam intactos ao longo das gerações, sendo fundamental para interpretações evolutivas sobre dados diversidade e para a compreensão de doenças genéticas (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003). Usando polimorfismos binários com baixas taxas de mutação, como os mencionados SNPs, uma filogenia pode ser facilmente construída (JOBLING; KING, 2004).

O conhecimento acerca da distribuição geográfica dos humanos ainda é impreciso, visto que muitas populações ainda não foram bem estudadas, e o tamanho das amostras não é suficiente de modo que algumas linhagens podem passar despercebidas (JOBLING; TYLER-

SMITH, 2003). Quando existe um indicativo de que há presença de uma linhagem, geralmente é uma afirmativa segura, mas não prova a ausência.

Devido ao fato de que os SNPs ocorrem com muita frequência no genoma, eles são considerados como fonte principal de informação para os estudos de ancestralidade e reconstrução da evolução humana (COSTA, 2011). Diante desse cenário, nos questionamos se podemos de fato traçar nossa ancestralidade por meio das populações antigas, ou se os nossos antepassados foram totalmente substituídos pelos migrantes posteriores.

Do balanço deste conjunto de informações sobre o estudo de marcadores genéticos do cromossomo Y, pode-se concluir que apesar da análise dos marcadores autossômicos ter maior poder de discriminação (CARVALHO, 2007), o estudo dos SNPs do cromossomo Y é de grande relevância, uma vez que eles influenciam diretamente características fenotípicas, dado que os SNPs são frequentes em regiões codificantes ou próximo delas (COSTA, 2011).

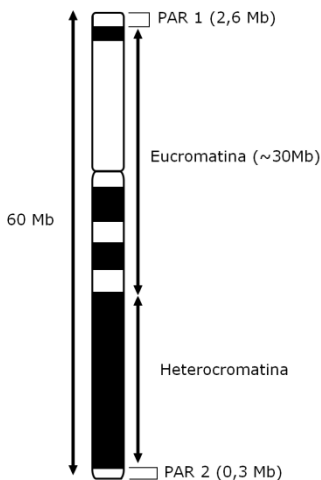
Cromossomo Y

Dois por cento do genoma humano é constituído pelo cromossomo Y, contendo aproximadamente 60 Mb (MUNIZ, 2008), a parte de heterocromatina localiza-se no braço longo, possui aproximadamente 30 Mb e é composta por sequência altamente repetitivas. Os marcadores genéticos do cromossomo Y caracterizam a herança paterna, uma vez que são completamente transmitidos para as gerações seguintes (JANNUZZI *et al.*, 2015), a menos que aconteça alguma mutação no meio do caminho (SINGH *et al.*, 2011).

O conhecimento sobre o cromossomo Y e seus marcadores genéticos é muito importante pois pode ser empregado em situações diferentes, incluindo estudos evolutivos e biogeográficos, além de investigações forenses e também sobre parentesco paternos (JANNUZZI *et al.*, 2015). O sequenciamento do cromossomo Y foi publicado em 2003, pelo instituto Whitehead e a Universidade de Washington (CARVALHO, 2007).

As porções distais dos braços do cromossomo Y recombinam com regiões homólogas do cromossomo X, são chamadas de pseudoautossômicas (PAR1 e PAR2) e representam apenas 3 Mb de seu comprimento (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003) (Figura 2).

Figura 2: Representação do cromossomo Y humano evidenciando as regiões PAR.



Fonte: Modificado de JOBLING; TYLER-SMITH, 2003

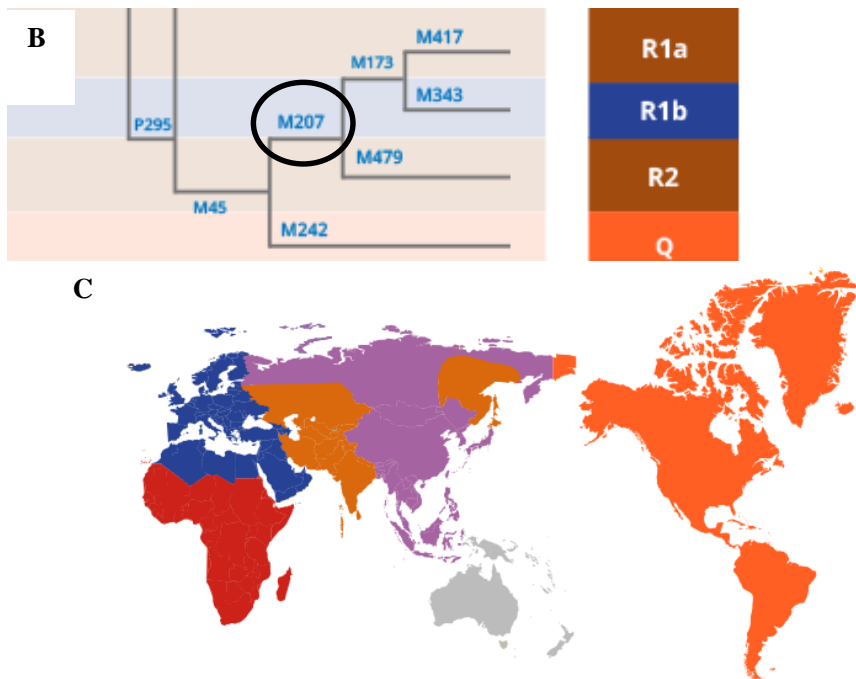
O cromossomo Y possui também uma região não recombinante (MSY) que compreende cerca de 95% de sua totalidade (CARVALHO, 2007). Essa região possui dois tipos de polimorfismos, uns mutam com uma relativa frequência e são chamado de microssatélites ou STRs, enquanto outros surgiram por mutações raras, e teriam acontecido, possivelmente, somente uma vez na história evolutiva do *Homo sapiens* (MACHADO *et al.*, 2005). Esse último tipo de polimorfismo é chamado de polimorfismo de base única (SNPs) e normalmente são bialélicos (MACHADO *et al.*, 2005).

Os marcadores SNP tem como base as modificações mais simples da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). As mutações mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina ($A \rightarrow G$) ou de uma pirimidina por outra pirimidina ($C \rightarrow T$) (CAETANO, 2009). Normalmente, os marcadores SNP são bialélicos, ou seja, geralmente são encontradas apenas duas variantes em uma espécie (Ex: no caso do marcador M207, um alelo corresponde a base A e o outro ao G). Devido às características particulares dos SNPs, como estarem localizados em regiões não recombinantes do cromossomo, os marcadores do cromossomo Y representam a prova real e a contrapartida masculina de estudos obtidos por inferências sobre o DNA mitocondrial (MARRERO, 2003).

Vários SNPs estão sendo reconhecidos na região não-recombinante do cromossomo Y, sendo que alguns deles são geográfico-específicos, tais como Q, (Ameríndio), P (Europeu) e E2 (Africano) (MACHADO *et al.*, 2005) (Figura 3).

De acordo com a última versão, de 2016, da Sociedade Internacional de Genealogia Genética (ISOGG - <http://isogg.org/tree/index.html>), acredita-se que o haplogrupo R (M207) do DNA-Y humano surgiu há aproximadamente 27.000 anos na Ásia. O haplogrupo R (DNA-Y) ainda se divide em duas sub-ramificações principais: R1 e R2. Estima-se que o R1 (M173) tenha surgido durante o período do Último Máximo Glacial, cerca de 18.500 anos atrás, provavelmente no sudoeste da Ásia. Os dois clados descendentes mais comuns de R1 são R1a e R1b. Acredita-se que R1a (M420) tenha surgido na estepe eurásia e hoje é mais frequentemente observado na Europa Oriental e na Ásia Ocidental e Central. R1b (M458) encontra-se em frequências próximas ou superiores a 30% na Europa Oriental. Já o R2 (M479) é mais frequentemente observado na Ásia, especialmente no subcontinente indiano e na Ásia central.

Figura 3: (continuação) A) Árvore filogenética do cromossomo Y. B) Aumento da árvore filogenética evidenciando o marcador estudado. C) Mapa genético global dos principais eventos mutacionais conhecidos.



Fonte: <https://genographic.nationalgeographic.com/tree-updates/>

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as variantes alélicas ancestral e derivada do marcador M207 (rs2032658) na população masculina de Santa Catarina, visando identificar padrões de ancestralidade com componente europeu.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✧ Caracterizar geneticamente quatro populações catarinenses (Grande Florianópolis, Lages, Blumenau e Joinville) com relação ao marcador M207 (rs2032658);
- ✧ Calcular as frequências alélicas do marcador M207 (rs2032658) na população catarinense;
- ✧ Verificar o conhecimento dos voluntários em relação à sua ascendência paterna;
- ✧ Comparar os resultados obtidos para as populações de Santa Catarina com aqueles oriundos de outros estudos, relacionando com fatos históricos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho faz parte de um projeto maior, coordenado pela Dr^a Ilíada R. de Souza e como participante a Dr^a Andrea Rita Marrero, intitulado “Estrutura Genética e Origem da População do Estado de Santa Catarina”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), no parecer n° 1077/11.

3.2 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram constituídas por sangue de 152 homens de Santa Catarina, atendidos pelo Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC) e unidades do HEMOSC em quatro diferentes centros urbanos de Santa Catarina (Joinville, Blumenau, Lages e Florianópolis). A coleta e processamento do sangue dos indivíduos foi feita por membros do LAPOGE. Após a coleta do sangue em tubos estéreis, estes foram devidamente identificados e transportados para o Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram rotulados e mantidos a 4°C até o momento da separação e preparação das análises biológicas. A amostra biológica de cada indivíduo utilizada neste trabalho foi então integrada ao Banco de DNA/LAPOGE onde permanecerá sob responsabilidade da Dra. Ilíada Rainha de Souza, coordenadora do laboratório. Os formulários de dados epidemiológicos deram-se no momento da coleta de sangue.

As amostras já se encontravam no banco de DNA do LAPOGE. Primeiro, foi preciso analisar os questionários do laboratório e selecionar apenas os homens e depois realizar uma triagem pelo banco de DNA para garantir que tínhamos todas as amostras necessárias.

O grupo amostral não possui histórico de parentesco e todos são residentes em Santa Catarina.

3.3 MARCADORES DO CROMOSSOMO Y

A região não recombinante do cromossomo Y tem sido motivo de inúmeros estudos na área da genética molecular pois é um sítio que apresenta desde mutações com uma relativa frequência, como é o caso dos microssatélites ou STRs, que servem como um marcador codominante, de fácil isolamento, porém com alta taxa de mutação e não muito abundantes; como também os SNPs que possuem um elevado grau de polimorfismo, são muito abundantes, e são muito úteis a fim de realizar

estudos comparativos, já que sua taxa de mutação é extremamente baixa (LOBO; AGUIAR, 2013).

Os SNPs estão sendo muito valiosos como marcadores genéticos para revelar a história evolutiva das populações e a sua ocorrência ao longo do genoma também os torna ideais para análises de especiação e demografia histórica (BRUMFIELD *et al.*, 2003).

Foi investigado um marcador do tipo SNP M207 (rs203265852) localizado na região não recombinante do cromossomo Y. O marcador do tipo SNP foi escolhido para este trabalho por ser um polimorfismo que surgiu por uma mutação rara e que provavelmente surgiu apenas uma vez na história evolutiva do *Homo sapiens*.

O sítio polimórfico no presente estudo incluiu 1 marcador binário SNP previamente publicado por Medina *et al.*, 2014. Foram produzidos três iniciadores para cada SNP, sendo dois os que reconhecem especificamente a sequência adjacente dos nucleotídeos para alelos derivados e ancestrais respectivamente e ao segundo foi adicionado uma cauda de nucleotídeos não complementares para distinguir os produtos de amplificação nos dois alelos e o terceiro oligonucleotídeo que delimita o tamanho do fragmento. O *primer* M207F1G é específico para o alelo derivado que se liga ao fragmento contendo o nucleotídeo “G”, enquanto que o *primer* M207F2A é específico para o alelo ancestral e se liga à mutação “A”. A diferença entre os fragmentos é uma cauda de 6 nucleotídeos na extremidade 5’, como mostra o Quadro 1.

Quadro 1: Sequência dos *primers* utilizados para a identificação do polimorfismo de um único nucleotídeo M207 (rs2032658). Os nucleotídeos não complementares estão apresentados em letras minúsculas. A variação nucleotídica (A/G) define o estado alélico ancestral/ derivado, respectivamente.

<i>Primer</i>	Sequência de Primers (5' → 3')	Tamanho do Fragmento
M207F1G	CgAGTCAAGCAAGcAATTTAG	118 pb
M207F2A	gtcacTAAGTCAAGCAAGAAATcTAA	124 pb
M207R	AAAAGCTGAAGGAAAAGTGA	

Fonte: MEDINA *et al.*, 2014

3.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DA AMOSTRA

A amostra foi dividida entre material biológico e dados epidemiológicos, obtidos através de coleta de sangue periférico e do preenchimento de um formulário (ANEXO B) de dados pessoais. As coletas ocorreram somente após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos voluntários (TCLE – ANEXO A).

As amostras de sangue periférico (cerca de 8 mL) foram coletadas através de punção venosa, para extração do DNA genômico, transportadas e armazenadas a 4°C, no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE). As amostras biológicas e os questionários obtidos nesta pesquisa foram catalogados e constituem um banco de amostras e dados do LAPOGE.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas (Centrifuge 206 BL Excelsa II®) a 1835 rpm durante 15 minutos em temperatura ambiente (TA), para a separação dos componentes sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos. Estes componentes sanguíneos foram transformados em alíquotas, identificados e estocados a -20°C. A camada de leucócitos foi utilizada para a extração do DNA genômico por conter a maior proporção de células nucleadas. O plasma e o concentrado de hemácias não foram utilizados neste estudo.

3.6 REAGENTES E SOLUÇÕES

- ☆ Solução de lise I (Tris-HCl 0,01 M; Sacarose 0,32 M; MgCl₂ 0,0025 M; Triton X 100 – 1%).
- ☆ Solução de lise II (Tris-HCl 0,01 M; KCl 0,05 M; MgCl₂ 0,0025 M; Nonidet 1%; TWEEN 20 – 1%).
- ☆ SDS 10%.
- ☆ Solução de Perclorato de sódio 5,0 M.
- ☆ Solução saturada de NaCl 6,0 M.
- ☆ TE (Tris-HCl 1 M; EDTA 0,5 M).
- ☆ Álcool isopropílico absoluto e Etanol 70%.

3.7 PROCEDIMENTO

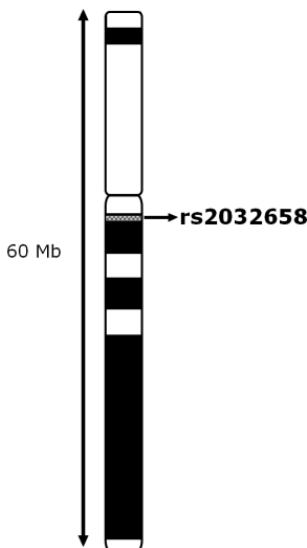
A extração de DNA foi realizada usando o método de *salting out* modificado por LAHIRI; NUMBERGER (1991), baseado em Miller *et al.* (1988). Para cada amostra, foram colocados 100 µL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5 mL (tipo *Eppendorf*), utilizando micropipeta e ponteiras estéreis. Em seguida, 1,0 mL de solução de Lise I foi adicionado em cada um destes microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (*Centrifuge 5415D, Eppendorf*®) a 12000 rpm durante 4 minutos a TA e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando somente a presença dos glóbulos brancos.

Posteriormente foram acrescentados ao precipitado de leucócitos 300 µL de Solução de Lise II, 10 µL de SDS 10% e 75 µL de Perclorato de Sódio 5 M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos, a cada tubo foi acrescentado 130 µL de solução saturada de NaCl e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos a TA. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para estes, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foi adicionado 300 µL de álcool isopropílico absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300 µL de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a TA, por 12 horas (ou *overnight*). Após a secagem dos precipitados, foi adicionado a cada tubo 100 µL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 minutos e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Os fragmentos, contendo ou não os SNPs de interesse, foram amplificados utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) realizada no Termociclador Veriti (*Applied Biosystems*®). Os *primers* empregados foram obtidos segundo Medina *et al.*, 2014 na literatura, assim como a sequência da região do cromossomo Y contendo o SNP M207 com 124 pb (G) e 118 pb (A). A sequência da região do cromossomo Y contendo o SNP M207 está destacada na Figura 4.

Figura 4: Cromossomo Y, em destaque a região com o polimorfismo de um único nucleotídeo.



Fonte: Modificado de <http://ybrowse.y-chromosome.org/gb2/gbrowse/chrY/?name=ChrY%3A15581983..15581983>

Diluição De Primers

Primeiramente os *primers* liofilizados foram centrifugados por 5 minutos antes de serem abertos. A cada *primer* foi adicionado água ultrapura segundo a bula especificada pelo fabricante (Alpha DNA®) para alcançar a concentração de 100 µL.

Após a diluição dos *primers*, foi feita uma solução de uso dos mesmos em conjunto, composto por: 20 µL M207F1G + 40 µL M207F2A + 20 µL M207R + 32 µL de água ultrapura.

Reagentes e Soluções

- ☆ Água ultrapura
- ☆ dNTPs 10 mM de cada
- ☆ MgCl₂ 50 mM
- ☆ Tampão de PCR (10x: 0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M KCl)
- ☆ Primer Forward 1 (10 µMol)
- ☆ *Primer* Forward 2 (10 µMol)
- ☆ *Primer* Reverse (10 µMol)
- ☆ *Taq Platinum*® 5U/µL

Procedimento

Para a reação de amplificação do *primer* M207 foi adicionado, em tubos de 0,6 µL (tipo *Eppendorf*®): 14,78 µL de água ultrapura; 0,32 µL de dNTPs (10 mM de cada); 0,6 µL de MgCl₂ (1,5 mM); 2,00 µL de Tampão de PCR (10x); 0,20 µL de solução de uso dos *primers* M207; 0,10 µL de *Taq Platinum*® (1 U/µL) e 2,00 µL de DNA, totalizando 20 µL para cada amostra.

Estas amostras foram colocadas no termociclador e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e, em seguida, a 33 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos (MEDINA *et al.*, 2014)

3.8 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

O produto amplificado foi separado por eletroforese em géis de poliacrilamida 10%.

Reagentes e Soluções:

- ☆ TEMED: tetrametiletenodiamina (Pharmacia Biotech).
- ☆ Solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1): 29 g de acrilamida; 1 g de bisacrilamida diluídas em 100 mL H₂O destilada.
- ☆ Solução de EDTA pH 8,0: 18,6 g de EDTA; 100 mL de H₂O destilada. Acertar o pH com gotas hidróxido de sódio (NaOH).
- ☆ Solução saturada de Persulfato de potássio (10%): 1 g de persulfato de potássio; 10 mL de H₂O destilada.
- ☆ Tampão TBE 10X (0,9 M) pH 8,0: 108 g de Tris (PM=121,1); 53 g ácido bórico (PM=61,83); 40 mL de solução de EDTA (pH 8,0); 400 mL H₂O destilada, ou até completar 1 L.
- ☆ Tampão TBE cubas (1X): 100 mL do tampão TBE (10X); 900 mL H₂O de potássio.
- ☆ GelRed®: 1 µL de GelRed® em 499 µL de DMSO (dimetilsulfóxido)
- ☆ Solução carreadora: 0,0025 g de azul de bromofenol, 0,4 g de sacarose e 1 mL de H₂O destilada.

Procedimento:

Para o SNP ligado ao cromossomo Y os produtos amplificados foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida 10% (PAGE). Estes foram feitos adicionando H₂O destilada à solução de acrilamida/bisacrilamida, a temperatura ambiente, antes da adição do TBE (10X). Os catalizadores da reação de polimerização do gel, TEMED e persulfato de potássio foram adicionados à mistura do gel

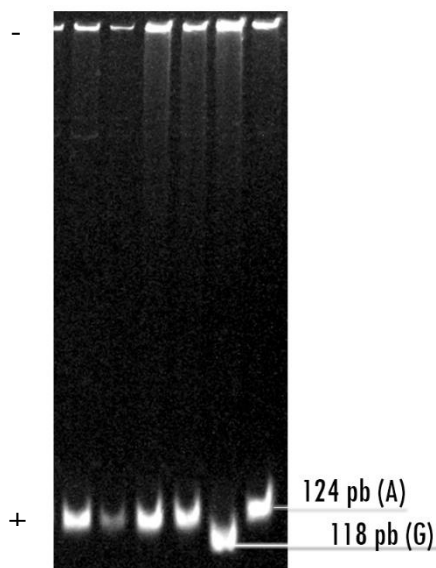
imediatamente antes de vertê-la em um cassete previamente montado, composto de duas placas de vidro separadas por espaçadores de teflon e presas com o auxílio de prendedores metálicos. O tamanho das placas foi de 22 cm x 17 cm. Logo após, um pente de teflon foi colocado na borda superior, formando poços no gel, onde posteriormente foram aplicadas as amostras de DNA amplificado por PCR. Aguardou-se a polimerização por no mínimo 1 hora. Após a polimerização do gel o pente foi retirado e os poços foram lavados com água.

O gel polimerizado foi montado em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE cubas (1x), em ambos os polos (porção superior e inferior). Esta cuba foi conectada a uma fonte de voltagem, PWSys - PW300, Biosystems®, ajustada à tensão constante de 200 V, necessária para uma boa separação dos fragmentos amplificados. Foi feita uma pré-corrida de pelo menos 20 minutos, onde a cuba com os géis foi ligada à fontes antes da aplicação das amostras e submetidas às condições de eletroforese. A fonte foi desligada e as amostras foram aplicadas nos poços.

Após a amplificação por PCR, em 10 µL do produto foi adicionado 4 µL do corante fluorescente GelRed®, 2 µL de solução carreadora e depois foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10 %, juntamente com uma amostra proveniente da PCR sem DNA (controle negativo) e uma amostra de um indivíduo com genotipagem conhecida (controle positivo).

Após a aplicação das amostras as fontes foram novamente ligadas e a eletroforese prosseguiu a corrida por 2 horas e 40 minutos. Com o término da corrida eletroforética, o gel foi retirado cuidadosamente das placas de vidro e registrado pelo fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro® e visualizado em foto. A anotação da leitura do genótipo foi feita considerando o tamanho dos fragmentos (124 pb para produtos com o nucleotídeo “A” e 118 para o produto com a mutação “G”) (Figura 5).

Figura 5: Imagem de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por transiluminador UV. Fragmentos de DNA de diferentes tamanhos podem ser visualizados: 124 pb e 118 pb.



Fonte: A autora (2016).

3.9 ANÁLISES DOS DADOS

A determinação do haplótipo e da frequência alélica foi realizada por contagem direta. Os resultados obtidos por essas análises foram comparados com resultados de estudos publicados para outras populações disponíveis na literatura.

4. RESULTADOS

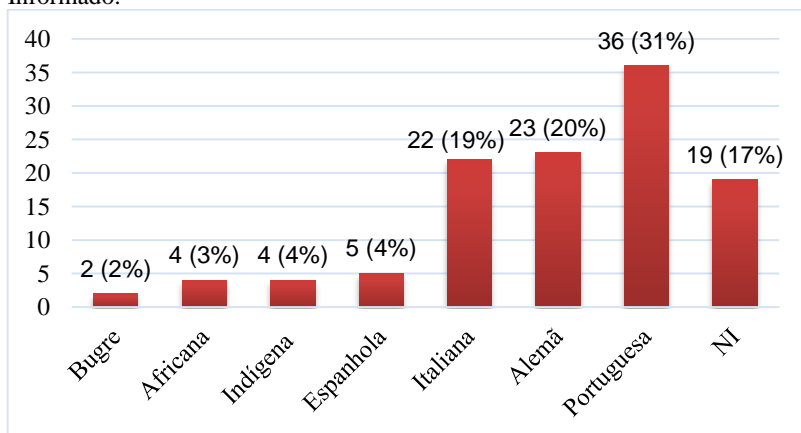
A amostra constituiu-se inicialmente por 152 indivíduos homens, porém, apenas 115 amostras puderam ser amplificadas, tornando-se este o novo número amostral. Todos os homens são residentes (nascidos ou não) em Santa Catarina, e não possuem parentesco aparente entre si. O total de amostras foi separado de acordo com 4 cidades de origem: Grande Florianópolis, Joinville, Blumenau e Lages. Buscou-se ter o mesmo número aproximado de amostras para cada região, totalizando: 27 amostras da Grande Florianópolis; 38 de Joinville, 35 de Blumenau e 15 de Lages. A relação do número de alelos ancestrais e derivados com a cidade informada pelo indivíduo está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Quantidade de alelos ancestrais e derivados de acordo com as diferentes cidades de Santa Catarina.

Município	Nº de alelos ancestrais (A)	Nº de alelos derivados (G)	Total
Grande Florianópolis	24	3	27
Lages	13	2	15
Blumenau	32	3	35
Joinville	37	1	38
Total	106	9	115

A todos os participantes foi perguntada a ascendência paterna, essa autoclassificação está representada no Gráfico 1.

Gráfico 1: Classificação e distribuição percentual de frequência de homens por ancestralidade informada. (Número de Indivíduos (Porcentagem)). NI = Não Informado.



Todos os homens analisados foram genotipados para o SNP M207 no cromossomo Y. A proporção entre os indivíduos que se autodenominaram descendentes de algum lugar com a genotipagem feita, está mostrada no Gráfico 2 para o alelo ancestral A, e no Gráfico 3 para o alelo derivado G.

Gráfico 2: Classificação e distribuição numérica e percentual da frequência de homens caracterizados pelo alelo A ancestral de acordo com a ancestralidade informada. (Número de Indivíduos (Porcentagem)).

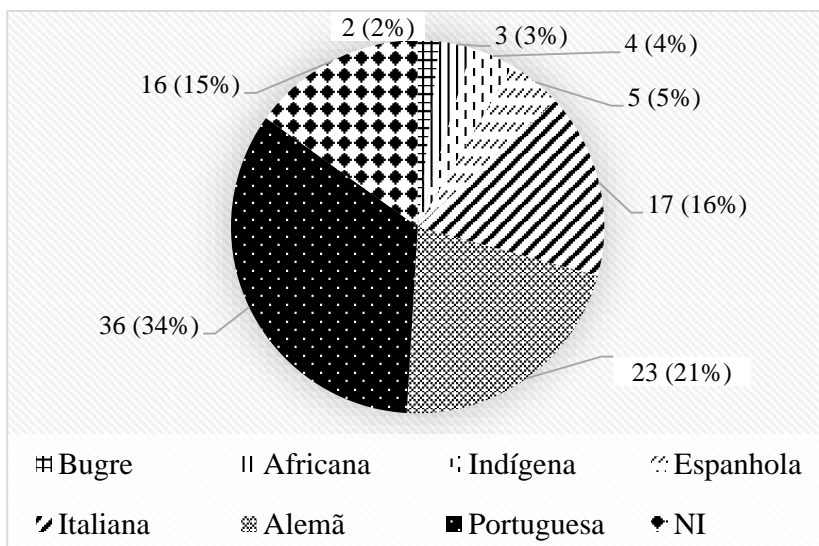
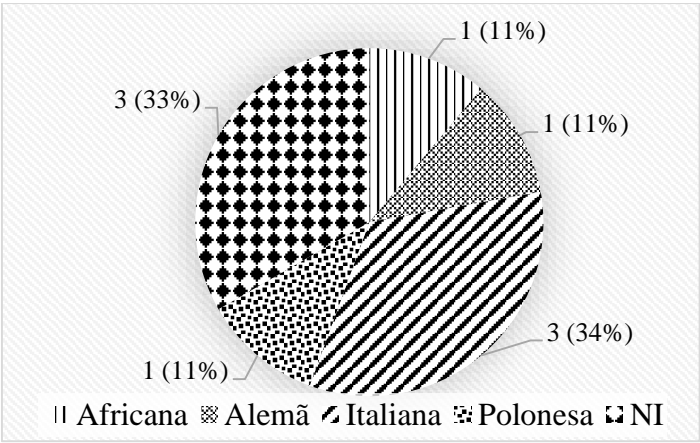
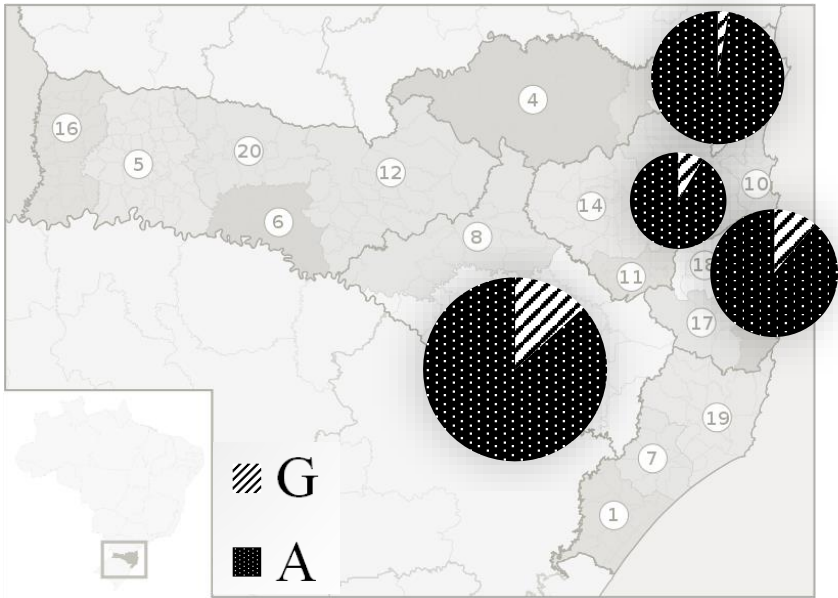


Gráfico 3: Classificação e distribuição numérica e percentual da frequência de homens caracterizados pelo alelo G derivado de acordo com a ancestralidade informada. (Número de Indivíduos (Porcentagem)).



Para melhor visualização das regiões e resultados de cada cidade, foi elaborada a Figura 6 com base nos dados da Tabela 1.

Figura 6: Mapa mostrando a proporção dos alelos do DNAY em cada cidade, bem como sua localização. Figura feita a partir de dados da Tabela 1. Mapa de Santa Catarina produzido por Darlan P. de Campos (2006).



O balanço geral das frequências dos alelos entre os indivíduos está resumido na Tabela 2.

Tabela 2: Frequência alélica total de voluntários para cada alelo do marcador M207.

Alelo	Frequência (%)
M207- G	7,86
M207- A	92,17

5. DISCUSSÃO

Do mar à serra, o relevo do Estado cooperou para a divisão das ondas migratórias. Os povos cuja tradição alimentar era ligada ao cultivo de peixes e frutos do mar, como os açorianos, conservaram-se no litoral, enquanto tradições agrícolas foram mantidas no vale e a pecuária se instalou no Oeste e na serra catarinense.

Santa Catarina era um lugar onde a imaginação dos imigrantes aflorava, uma terra desconhecida com muitas oportunidades, onde o solo, além de abundante, era bom para o plantio, e não havia concorrência. Somado a este fato, o sentimento de liberdade contribuiu muito para a vinda de muitas ondas migratórias.

A chegada das primeiras levas de imigrantes alemães em Santa Catarina aconteceu no ano de 1828 (JOCHEM, 2012), no entanto, o maior afluxo de imigrantes ocorreu a partir de 1850, com a fundação das colônias que hoje constituem as cidades de Blumenau, Brusque e Joinville (PIAZZA; HÜBENER, 1997).

Na época do mandado de Getúlio Vargas, no Sul do Brasil, ocorreu uma política de nacionalização onde houve uma intensa preocupação em relacionar o uso da língua ao sentimento de brasilidade, a partir de então muitos teuto-brasileiros e ítalo-brasileiros que moravam aqui foram forçados a abandonar o uso do alemão e do italiano, mesmo quando não tinham o domínio da língua portuguesa (BRANCO, 2001).

Em Santa Catarina as colônias que aqui se estabeleciam serviram como núcleos difusores de colonos para várias regiões do Estado, foi onde alemães e teuto-brasileiros se deslocaram principalmente para Lages e Blumenau. O segundo texto *Imigração e Colonização*, de Lourival Câmara (1940) que acena para o movimento migratório de alemães para o planalto lageano.

Lourival Câmara teceu um inventário completo sobre a presença de imigrantes no Estado de Santa Catarina, frisando os municípios e distritos onde os mesmos se encontravam. Segundo o autor, os alemães que se fixaram em Lages estavam sediados no distrito de Cerro Negro (CÂMARA, 1940), apesar de os grupos étnicos não estarem separados por municípios, podemos perceber pelo gráfico 1 que a quantidade de descendentes de alemães é a segunda maior nacionalidade informada, além de que Lages é o maior município de Santa Catarina, essa proporção é esperada.

A colonização em Blumenau também é marcada pelos alemães. Dois de setembro é a data que marca a vinda dos primeiros 17 imigrantes

alemães na cidade de Blumenau, tornando-se mais tarde a data de aniversário da cidade (NICOCELI, 2014).

Segundo Seyferth (2007) o mais importante da causa era de que a imigração e colonização alemã deveriam se efetivar com o povoamento pela pequena propriedade de terras; onde prevalecesse a criação de núcleos coloniais pequenos baseados no trabalho livre, que por sua vez, chegariam ao objetivo de por um fim à escravização. No entanto, o período era conturbado em relação a estas mudanças, principalmente no que se refere a disputa da substituição da mão de obra escravizada pelo trabalho imigrante.

O cenário sócio-político e econômico da Alemanha no período da formação da Colônia Dona Francisca (atual Joinville) era de total incentivo para quem tomasse a decisão de embarcar. Então, imigrantes das classes média e baixa alemã passaram a ser tornar pequenos produtores familiares na Colônia Dona Francisca (SCHLINDWEIN, 2011). Primeiramente vieram os homens, pois a falta de um sistema de saúde para as doenças que não existiam na Alemanha tornava a presença das mulheres “desaconselhável” no Brasil.

Por último, a região da Grande Florianópolis é predominantemente de ascendência de portugueses açorianos, onde a base demográfica constituiu-se da mistura de portugueses, africanos e ameríndios, que costumavam oferecer suas mulheres aos portugueses como forma de proteção de agressões e saques em suas aldeias (FLORES, 2000).

Este último fato pode ser comprovado pela análise do DNA mitocondrial. Estudos realizados por TORRES (2014): os resultados obtidos pelo sequenciamento de HVS I de mtDNA apontaram uma contribuição ameríndia em Santa Catarina de 24%. Foi encontrada ainda uma linhagem ameríndia que somente foi descrita para populações Guarani, indicando que populações atuais miscigenadas com esta mutação seja o reflexo da assimilação de haplogrupos ameríndios (TORRES, 2014).

Acredita-se que o SNP que define o haplogrupo R surgiu durante a era do Paleolítico Superior: cerca de 19.000 - 27.000 anos atrás (ISOGG 2016; KARAFET *et al.*, 2008).

O haplogrupo R é antecedido por oito mutações: M207, M306, P224, P227, P229, P232, P280 e P285 (KARAFET *et al.*, 2008). Isto configura um total de 16 mutações internas para este clado. Este haplogrupo está predominantemente presente na Europa, Leste e Sul asiático e Norte da África (OVEN, VAN *et al.*, 2014), sendo descendente do haplogrupo P-M45 (KARAFET *et al.*, 2008).

O Haplogrupo R é definido pelo SNP M207. A maior parte do Haplogrupo R está representada no subclado descendente R1, que provavelmente se originou nas estepes euroasiáticas. O haplogrupo R1 possui dois subclados descendentes: R1a e R1b. O R1a está associado com os povos proto-Indo-iraniano e Balto-eslavo, e são encontrados majoritariamente na Ásia do Sul e central, e na Europa Oriental. Já o haplogrupo R1b é dominante na Europa Ocidental e também podendo ser encontrado em menor escala em alguns povos da Ásia e da África (ISOOG, 2016).

Quando ocorre a mutação ($A \rightarrow G$) o indivíduo vai seguindo a árvore filogenética (como mostra a Figura 3), podendo ser do haplogrupo R1b, por exemplo. O R1b (M412), como já mencionado, é o haplogrupo do cromossomo Y mais comum na Europa Ocidental (>70%), sendo praticamente ausente no Próximo Oriente e na Ásia Ocidental (MYRES *et al.*, 2011). Podemos inferir isso com base no Gráfico 3, onde a presença do alelo derivado (G) indica um maior percentual de ascendência não ibérica.

Estudos realizados em outras regiões da América do Sul, com conhecida história de colonização, comprovam a utilização do marcador M207 como marcador europeu. Um estudo no Peru, feito por Sandoval (2013), apresentou uma frequência superior (60,1%) do haplogrupo Q-M3, maior do que outros haplogrupos, em especial quase três vezes maior que a frequência da linhagem europeia R-M207 (18,8%) (SANDOVAL, 2013).

O presente estudo analisou a contribuição ancestral europeia de uma amostra de indivíduos homens em 4 municípios distintos de Santa Catarina, Brasil. Esta análise mostrou elevada contribuição europeia nos portadores do SNP M207. Isto sugere que a mutação M207, responsável por 92,17% (Tabela 2) de pessoas com o alelo ancestral A, podem ser, de fato, de origem europeia, tendo sido ocasionado nestas populações pela migração de europeus.

Comparando as diferentes contribuições individuais, entre os grupos, verificamos que os indivíduos que possuem o alelo A têm contribuição europeia mais elevada.

Segundo Callegari-Jacques & Salzano (1999), dos imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1972, 58% eram europeus, 40% africanos e apenas 2% asiáticos. Com a abertura dos portos em 1808, aumentou o fluxo de imigrantes provenientes da Europa e permaneceu acentuado até o início do século XX, por isso é correto afirmar que a colonização do Brasil é um fato relativamente recente. Estima-se que entre 1820 a 1975, tenham entrado no Brasil seis milhões de europeus,

sendo que destes 70% eram portugueses e italianos (MACHADO, 2012), pode-se confirmar este fato pelo Gráfico 1, onde descendentes de portugueses e italianos somam 50% do total de indivíduos participantes do presente estudo. Outras populações como espanhóis, alemães, árabes, judeus, poloneses e japoneses também fizeram parte do contingente de imigrantes (IBGE, 2000).

Na análise de diferenciação populacional genotípica não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as 4 cidades: Grande Florianópolis, Blumenau, Lages e Joinville (dados não mostrados) (Figura 6). Esse fato pode ser explicado porque o processo de colonização do Brasil como um todo foi marcado pela imigração, principalmente de europeus (MACHADO, 2012). No caso de Santa Catarina, a região central em direção à parte litorânea, recebeu maior número de imigrantes europeus, interferindo no tamanho populacional e na distribuição territorial dos indígenas, promovendo a erradicação e/ou deslocamento deste povo cada vez mais para o interior do estado (MACHADO, 2012).

Para os 4 municípios estudados, a frequência de alelos ancestrais e derivados não foi significativamente diferente, podendo-se inferir que a estrutura populacional delas é basicamente a mesma, predominando a ascendência europeia (Figura 6).

No geral, observou-se um elevado número de indivíduos de autodenominação europeia, que de fato se confirmou pelo marcador M207. Na sequência, observamos uma frequência muito baixa de indivíduos auto classificados como africanos, poloneses e ameríndios. A presença destes componentes pode ser explicada pelo fato de a população brasileira ser uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de miscigenação, principalmente com contribuições de indivíduos europeus, africanos e ameríndios (MARRERO *et al.*, 2007). Houve ainda, indivíduos que não declararam sua ascendência (NI), mas que mesmo assim puderam ser avaliados de acordo com o SNP M207.

Os eventos de miscigenação em Santa Catarina, na maioria das vezes, aconteceram entre homens de linhagens euroasiáticas com mulheres ameríndias, situação já descrita por Torres, 2014 pelo marcador materno de mtDNA quando comparado ao uniparental paterno.

Segundo pesquisas do IBGE, o ápice do processo migratório não ocorreu, como seria de esperar, durante o período colonial, mas nas décadas posteriores de sua Independência.

Das 90 pessoas que se autodeclararam provenientes de descendência paterna europeia (portuguesa, alemã e italiana), mais de 70% de fato pertencem ao haplogrupo R. Isto é esperado na população de

Santa Catarina porque, como já visto, ondas migratórias no Estado são muito recentes, e as pessoas ficaram vivendo em grupos derivados de sua cultura, como é o caso de vilas germânicas, italianas e açorianas. Esta correlação com a ancestralidade é mais difícil em outras regiões do Brasil, visto que as populações chegaram e foram se espalhando para outros lugares em busca de melhores condições. No Rio Grande do Sul, por exemplo, os grandes pontos de encontro são os CTGs (Centro de Tradições Gaúchas), onde a população não necessariamente se reúne por ser de uma determinada ascendência, mas sim pelo fato de ser gaúcho.

Santa Catarina também se diferencia dos demais Estados por ter um histórico de colonização particular, na qual participam também as três populações principais (europeus, africanos e ameríndios), porém a migração europeia não cessou com o passar dos anos, diferente de outros lugares do Brasil que as ondas migratórias aconteceram e cessaram, em Santa Catarina os europeus continuaram vindo até muito recentemente, por isso podemos dizer que os processos migratórios são ainda muito contemporâneos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises e resultados apresentados neste estudo, conclui-se que:

- ☆ A técnica de genotipagem do SNP M207 foi otimizada;
- ☆ Este foi o primeiro trabalho que verificou as frequências do polimorfismo *M207* em amostras do estado de Santa Catarina.
- ☆ Outros estudos com marcadores SNPs devem ser realizados de forma a esclarecer melhor o perfil genético da população de Santa Catarina.
- ☆ Apesar de ser considerado um Estado de influência essencialmente europeia, Santa Catarina tem uma rica história de colonização proveniente de diversas partes do mundo. Estudos mostram que existem perfis diferentes quando se leva em consideração as distintas regiões catarinenses.
- ☆ Devido à frequência desta mutação (M207) na população de Santa Catarina, como um todo, pode ser indicada a implementação do estudo molecular mais aprofundado e com mtDNA para se ter uma correlação com a parte feminina do Estado.
- ☆ Há de se pensar que apesar da sempre bem descrita a contribuição europeia para a formação do acervo genético dos catarinenses, a parcela ameríndia costuma ser subestimada ou mesmo desconsiderada, estudos com o haplogrupo Q tornam-se necessários nesse sentido para preencher essa falta de informações, porém, investigações genéticas, como a do presente estudo, são essenciais para recordar e reafirmar a contribuição dos europeus que estiveram e estão em Santa Catarina.
- ☆ A existência de um banco de dados *online* com os questionários respondidos pelos indivíduos seria de extrema utilidade para estudo desse tipo, pois nos permitem fazer inferências e análises muito mais rápidas do que são atualmente.
- ☆ Embora este estudo seja limitado por seu poder inferencial, os resultados justificam um modelo demográfico predominantemente europeu, como era esperado, levando em consideração toda a história de colonização de Santa Catarina.
- ☆ Como mutação é a única força que atua para diversificar haplótipos do cromossomo Y, compreender a dinâmica de mutação é importante para entender as origens da diversidade de haplótipos (JOBLING; KING, 2004).

REFERÊNCIAS

- AVILA, M. C. P. OS CARIJÓS NA HISTORIOGRAFIA E NOS LIVROS. , 2010.
- BETHELL, L. Os índios do Brasil em 1500. **História da América Latina**. São Paulo: ed., 1998. Brasília: DF: Fundação Alexandre Gusmão.
- BRANCO, J. DE S. C. **Alemães em Lages: uma trajetória de conflitos e alianças guardadas pela memória**, 2001. Universidade Federal de Santa Catarina.
- BRUMFIELD, R. T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D. A.; EDWARDS, S. V. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 5, p. 249–256, 2003.
- BUENO, L.; DIAS, A. Povoamento inicial da América do Sul: contribuições do contexto brasileiro. **Estudos Avançados**, v. 29, n. 83, p. 149–171, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142015000100149&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .
- CAETANO, A. R. Marcadores SNP: Conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 64–71, 2009.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SALZANO, F. M. Brazilian Indian/non- Indian interactions and their effects. **Cienc Cult**, v. 51, n. November, p. 166–174, 1999.
- CARVALHO, C. A. M. DE. **Aplicação Médico-Legal da PCR em Tempo Real na Caracterização de SNPs**Terra, 2007. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- CARVALHO, M.; BENTO, A. M.; ANDRADE, L.; et al. Y chromosome SNP analysis in a Portuguese population sample using a multiplex PCR and minisequencing strategy. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 1, n. 1, p. 190–191, 2008.
- COSTA, H. N. R. **Marcadores genéticos de previsão de fenótipos em**

contexto forense, 2011. Universidade de Aveiro.

CRAWFORD, M. H. Anthropological Genetics in the 21st Century: Introduction. **Human Biology**, v. 72, n. Special Issue on Anthropological Genetics in the 21st Century, p. 11, 2000. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/41465808>>. .

DANTAS, G. C. D. S. Povoamento Brasileiro. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/historiab/povoamento-brasileiro.htm>>. Acesso em: 21/9/2016.

DERENGOSKI, P. R. **Saga dos Guarani: Guerreiros , Gaúchos e Gaudérios**. Insular ed. Florianópolis, 2002.

FARIAS, V. F. DE. **Dos Açores ao Brasil Meridional: uma viagem no tempo; 500 anos, Litoral Catarinense**. Ed. do Aut ed. Florianópolis, 2000.

FLORES, M. B. R. **Povoadores da Fronteira: os casais açorianos rumo ao Sul do Brasil**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2000.

FROTA, L. S. DE A. E. **Brasil-Argentina: divergências e convergências**. Brasília-DF: Centro Grafico do Senado Federal, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA - IBGE. **Brasil: 500 Anos de Povoamento**. Rio de Janeiro. 2000. Disponível em: < www.ibge.gov.br>.

INTERNATIONAL SOCIETY OF GENETIC GENEALOGY (2016). Y-DNA Haplogroup Tree 2016, Version: 11.316, Date: 19 November 2016, <http://www.isogg.org/tree/> [Data de acesso: 20/11/2016].

JANNUZZI, J.; SILVA, D. A.; CARVALHO, E. F. Characterization of the STR loci allele's distribution of Y chromosome with high mutation rate in population sample of Rio de Janeiro. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, 2015.

JECUPÉ, K. W. **A terra dos mil povos: história indígena brasileira contada por um índio**. 2nd ed. São Paulo: Fundação Peirópolis, 1998.

JOBLING, M. A.; KING, T. E. The distribution of Y-chromosomal

haplotypes: forensic implications. **International Congress Series**, v. 1261, p. 70–72, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531513103017874>>. .

JOBLING, M. A.; TYLER-SMITH, C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 8, p. 598–612, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897772>>. .

JOICHEM, T. 180 anos de imigração alemã em Santa Catarina. , 2012.

KARAFET, T. M.; MENDEZ, F. L.; MEILERMAN, M. B.; et al. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 830–838, 2008.

LAHIRI, D. K.; NUMBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LEVENE, R. **Lecciones de historia argentina; historia de la civilizacion argentina**. Buenos Aires: Lajeuane, 1950.

LIMA, M. **Povoamento e história demográfica dos Açores: o contributo da genética**. 2008.

LOBO, D.; AGUIAR, C. Marcadores Genéticos. , 2013.

LONG, J. C.; BORTOLINI, M. C. New Developments in the Origins and Evolution of Native American Populations. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 146, 2011.

LUCIANO, G. DOS S. **O Índio Brasileiro: o que você precisa saber sobre os povos indígenas no Brasil de hoje**. LACED/Muse ed. Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Continuada, Alfabetização e Diversidade, 2006.

MACHADO, R. B.; HÜNEMEIER, T.; JR, V. G.; SALZANO, F. M. Filogeografia do cromossomo y em uma população negra do rio de janeiro. , p. 434, 2005.

MACHADO, T. M. B. **MIGRAÇÃO, ESTRUTURA POPULACIONAL, TIPOS DE CASAMENTOS E DOENÇAS GENÉTICAS**, 2012. Fundação Oswaldo Cruz.

MARRERO, A. R. **OS GAÚCHOS: SUA HISTÓRIA EVOLUTIVA REVELADA A PARTIR DE MARCADORES GENÉTICOS**, 2003. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SU.

MARRERO, A. R.; BRAVI, C.; STUART, S.; et al. Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: The case of the Gaucho from southern Brazil. **Human Heredity**, v. 64, n. 3, p. 160–171, 2007.

MEDINA, L. S. J.; MUZZIO, M.; SCHWAB, M.; et al. Human Y-chromosome SNP characterization by Multiplex amplified product-length polymorphism analysis. **Electrophoresis**, p. 1–40, 2014.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MONTEIRO, J. M. Os Guarani e a História do Brasil Meridional: Séculos XVI-XVII. In: da C. M. Carneiro (Ed.); **História dos índios no Brasil**, 1998. São Paulo: Companhia das Letras.

MOSIMANN, J. C. **Catarinenses: gênese e história**. Ed. do Aut ed. Florianópolis, 2010.

MUNIZ, Y. C. N. Marcadores Genéticos de Ancestralidade em Comunidades Fundadas por Açorianos na Ilha de Santa Catarina. , p. 124, 2008.

MYRES, N. M.; ROOTSI, S.; LIN, A. A; et al. A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 19, n. 1, p. 95–101, 2011.

NICOCELI, V. **Hermann Blumenau: Uma Experiência De Colonização Em Santa Catarina (1846-1884)**, 2014. Universidade Federal do Paraná.

NOVAIS, F. A.; SEVCENKO, N. **História da vida privada no Brasil:**

República: da Belle Époque à era do rádio. São Paulo: Companhia das Letras, 1998.

OVEN, M. VAN; GEYSTELEN, A. VAN; KAYSER, M.; DECORTE, R.; LARMUSEAU, M. H. Seeing the wood for the trees: A minimal reference phylogeny for the human Y chromosome. **Human Mutation**, v. 35, n. 2, p. 187–191, 2014.

PEDRO, J. M.; CZESNAT, L. DE O.; FALCÃO, L. F.; et al. **Negro em terra de branco: escravidão e preconceito em Santa Catarina no século XIX.** Porto Alegre: Mercado Aberto, 1988.

PIAZZA, W. F. **A Colonização Italiana em Santa Catarina.** Florianópolis, 1976.

PIAZZA, W. F.; HÜBENER, L. M. **Santa Catarina: História da Gente.** Lunardelli ed. Florianópolis, 1997.

RIBEIRO, D. **As Américas e a Civilização: Processo de formação e causas do desenvolvimento desigual dos povos americanos.** São Paulo: Companhia das Letras, 2007.

SAINT PIERRE, M. DE; GANDINI, F.; PEREGO, U. A.; et al. Arrival of Paleo-Indians to the Southern Cone of South America: New Clues from Mitogenomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–9, 2012.

SALZANO, F. M.; HUTZ, M. H. Genética, genômica e populações nativas brasileiras: história e biomedicina. **Revista de Estudos e Pesquisas (FUNAI)**, v. 2, n. 1, p. 175–197, 2005. Disponível em: <http://www.funai.gov.br/arquivos/conteudo/cogedi/pdf/Revista-Estudos-e-Pesquisas/revista_estudos_pesquisas_v2_n1/5.Genetica_genomica_e_populacoes_nativas_brasileiras_historia_e_biomedicina.pdf>. .

SANDOVAL, J. R. **História Genética das Populações Peruanas**, 2013. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

SANS, M. **Admixture studies in Latin America: From the 20th to the 21st century.** 2000.

SANS, M.; FIGUEIRO, G.; HIDALGO, P. C. A new mitochondrial C1

lineage from the prehistory of Uruguay: population genocide, ethnocide, and continuity. **Hum Biol**, v. 84, n. 3, p. 287–305, 2012.

SANS, M.; SALZANO, F. M.; CHAKRABORTY, R. Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. **Hum Biol**, v. 69, n. 2, p. 161–170, 1997.

SANTOS, M. D. O. A Imigração Italiana para o Rio Grande do Sul no final do século XIX. **Arquivoestado.Sp.Gov.Br**, p. 1–11, 1972. Disponível em: <http://www.arquivoestado.sp.gov.br/historica/edicoes_anteriores/pdfs/historica09.pdf>. .

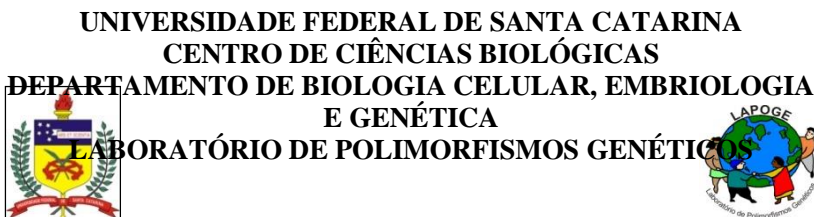
SCHLINDWEIN, I. Julie Engell: um novo olhar sobre a Colônia Dona Francisca. , p. 100, 2011.

SEYFERTH, Giralda. **O Vale do Itajaí e a política Imigratória do Império**. Blumenau em Cadernos. Edição especial 50 anos. Tomo XLVIII. Nov/Dez. nº 11-12, 2007

SINGH, N. P.; MADABHUSHI, S. R.; SRIVASTAVA, S.; et al. Epigenetic profile of the euchromatic region of human y chromosome. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 9, p. 3594–3606, 2011.

TORRES, S. R. R. **Avaliação da estrutura genética da população atual de Santa Catarina com diferentes marcadores moleculares para aplicação na genética forense**, 2014. Universidade Federal de Santa Catarina.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos controles.



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos de Pesquisa:

“Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”
e

“GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATOIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA.”

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes. Para isto pedimos sua colaboração e permissão para fazer parte do grupo controle e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de DNA (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas.

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário irá conter dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

Riscos:

A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios


Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas: _____


Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ____/____/____

ANEXO B - Questionário para indivíduos controles.



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG
Laboratório de Polimorfismos Genéticos



QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE

IDENTIFICAÇÃO

Data: __/__/__ Coleta: () sangue

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

Idade: ____ Sexo: () M () F Data de nascimento: ____/____/____

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não

Escolaridade: () analfabeto () 1º grau incompleto

() 1º grau completo () 2º grau incompleto

() 2º grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência:

Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente

() Asiático descendente () Indígena descendente

Cor da pele: () negra () mulata () amarela () branca

Observação: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência do pai:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Possui filhos: () Sim () Não Quantos: _____

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não

Frequência:

() Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não

Tipo: _____

Quantidade: () menos de 30 min () 30 min () 1h () mais de 1 h

Frequência: () 1x semana () 2-3x semana () 4-6x semana

() Todos os dias () Menos de 1x semana

Você FUMA? () Sim () Não Você já FUMOU? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Entrevistador: _____ Data da entrevista: ____/____/____

Nome: _____

Identificação: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª estação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total (meses): _____

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? () Sim () Não

Já utilizou AC? () Sim () Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC:

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

Faz TRH? () Sim () Não Já fez TRH? () Sim () Não

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações: _____

Histórico Médico

Caso de CÂNCER pessoal? () Sim () Não

Tipo: _____

Casos de CÂNCER DE MAMA na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: () filha () irmã () mãe () avó

() tia materna 1º grau () tia paterna 1º grau

() prima materna 1º grau () prima paterna 1º grau

() Outros _____

Casos de CÂNCER de outro tipo na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Caso de TUMOR BENIGNO pessoal? () Sim () Não

Local: _____

Caso de DOENÇA AUTOIMUNE pessoal? () Sim () Não

Qual?

Tempo de diagnóstico: _____

Casos de DOENÇA AUTOIMUNE na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Você tem alguma DOENÇA CARDIOVASCULAR? () Sim () Não

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: () Sim () Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: () Sim () Não

OSTEOPOROSE: () Sim () Não

DOENÇA REUMÁTICA: () Sim () Não

DIABETES: () Sim () Não

ASMA: () Sim () Não

HIV: () Sim () Não () Nunca fez exame

HEPATITE: () Sim () Não () Nunca fez exame

DENGUE: () Sim () Não

TUBERCULOSE: () Sim () Não

DISTÚRBIO RENAL: () Sim () Não

DISTÚRBIO PULMONAR: () Sim () Não

DISTÚRBIO HEPÁTICO: () Sim () Não

Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: () Sim () Não

Grau de parentesco: _____

Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: () Sim () Não

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS: _____

Alérgico a algum medicamento?

Alérgico a algum alimento?

Teve DEPRESSÃO? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:
